

不同地区牛瑟氏泰勒虫主要 抗原 32k 蛋白编码基因酶谱分型

魏 强 辻正义* 石原智明* 获原克郎* 高桥清志*

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100021)

摘 要 提取日本和澳大利亚等不同地区牛红细胞感染瑟氏泰勒虫的 DNA, 利用其主要表面抗原 32 k 蛋白编码基因的 5' 和 3' 端附近序列合成一对引物, 经 PCR 方法扩增出约 900bp 大小的基因片段, 连接入 pBR322 质粒中, 转化入大肠杆菌 JM 109 中, 经四环素及氨苄青霉素培养筛选出 20~30 个克隆, 再用 PCR 方法扩增出每个克隆的靶基因, 经 Hind III、Bgl I 和 Kpn I 限制性内切酶消化后电泳, 可分出 1 型、2 型和 3 型不同酶谱电泳型, 且证明不同地区牛感染此原虫的类型不同。

关键词 瑟氏泰勒虫, PCK, 质粒构建, 限制性内切酶分析

瑟氏泰勒虫是牛最常见的血液原虫病, 呈世界性分布, 尤其在发展中国家更为突出, 临床表现为发热、死亡; 或体弱和贫血, 抵抗力低下致继发感染而死亡。由于其抗原成分复杂, 机体的免疫效果不理想, 有学者分离提纯其表面主要抗原 32 k 蛋白, 经电泳及血清学检查发现差异, 提示此抗原呈现多样性^[2,3]。日本学者曾成功地用 SCID 小鼠做成牛红细胞感染瑟氏泰勒原虫的模型, 为此病的深入研究带来可能^[1]。考虑到这种蛋白抗原的不同, 提示其编码基因可能也不同, 地区分布可能有差异, 本实验以其基因 5' 及 3' 端附近的序列为模板合成引物, 插入质粒在大肠杆菌中增殖克隆, 筛选 20~30 个克隆 (不同地区株), 然后扩增每个克隆靶基因, 行限制性内切酶消化分析, 以期了解编码基因的多态性和地区分布, 从而为制备完善疫苗提供有益依据。

1 材料和方法

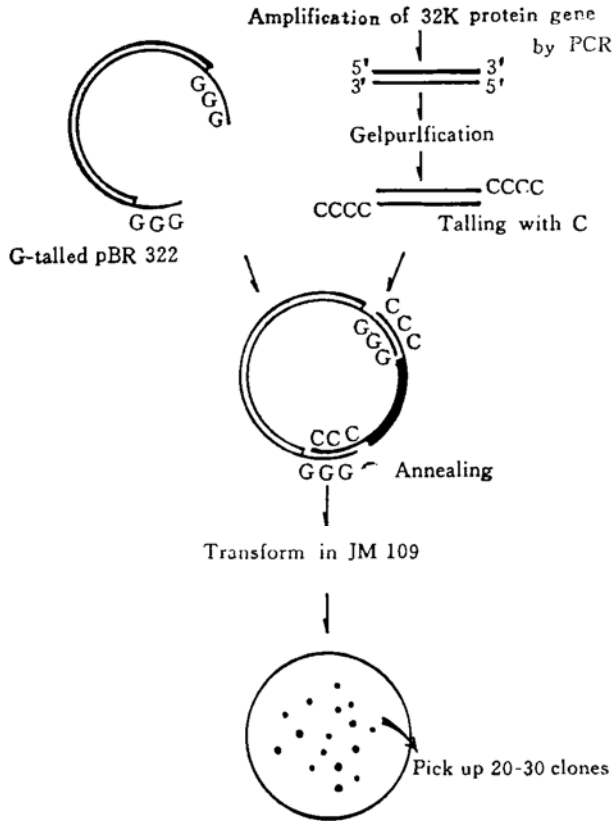
1.1 材料来源及 DNA 制备 澳大利亚感染牛红细胞株、千本株和草地场株分别来自澳大利亚及日本两个地区, 由石原实验室提供。红细胞经冻融裂解后, 用适量 10% SDS 处理, 蛋白酶 K 56°C 消化 2 h, 酚提取 3 次, 酒精沉淀抽干后溶于适量 TE 缓冲液中。

1.2 PCR 法扩增 32k 表面蛋白编码基因^[5] 以其 5' 和 3' 端附近序列合成一对引物, 分别为 5'-CACTGCTATGTTGTCCAAGA-3' 和 5'-TGTGAGACTCAATGCGCCTA-3', 常规 PCR 反应液, 93°C 40 s 变性, 37°C 退火 10 s 和 72°C 延伸 2 min, 总共进行 30 个热循环。从构建质粒中扩增靶基因方法相同。

* 日本酪农学园大学兽医学科。

** 收稿日期 1994-09-09。

1.3 32k 表面蛋白编码基因克隆 PCR 产物经1.5%琼脂糖电泳分离纯化后, 取微量 TdT 聚合酶在37°C 25min 条件下加尾 dC, 提纯后和少量已加尾 dG 的 PBR 322 质粒, 65°C 复性 10min, 40°C复性 2 h。将重组质粒导入感化的大肠杆菌 JM109 中, 经 Tet^r/Amp^s 培养基筛选20~30个克隆, 具体步骤如下图示^[4]。



1.4 限制性内切酶消化分型分析 将不同株的每个克隆用 2 ml LB 基液过夜37°C培养, 煮沸法提取质粒 DNA, PCR 扩增 32 k 表面抗原蛋白的编码基因, 经 Hind III、Kpn I 和 Bgl I 限制性内切酶消化充分后, 行电泳分析谱图。

2 结果

2.1 PCR 扩增 32k 表面蛋白基因 从三株牛瑟氏泰勒焦虫 DNA 中扩增到大约 900bp 大小的基因片段, 和已报道的相同, 三株之间未见差异。从构建质粒中扩增的产物大小也相同, 见图 1。

2.2 32k 蛋白编码基因 PCR 产物的克隆及克隆基因限制性内切酶谱分型分析 三株不同地区来源的基因片段插入到质粒 PBR322 中, 在 JM109 菌中克隆, 经 Tet^r/Amp^s 培养基筛选出20~30个克隆, 经 LB 基液增殖后提取质粒 DNA, 再用 PCR 方法分别从三株每个克隆 DNA 中扩增出目的基因, 用 Hind III、Bgl I 和 Kpn I 充分消化后电泳, 经分析主要可分为 3 型。1 型中 Hind III 和 Bgl I 有一个酶切点, Kpn I 有两个酶切点; 2 型中

Hind III 没有酶切点, Bgl I 和 Kpn I 各有一个酶切位点; 3型中 Hind III 有 2 个酶切点, Bgl I 和 Kpn I 有一个酶切位点。另有一些不能被上述酶所消化。见图 2。澳大利亚株以 1 型为主 (76%) 2 型其次。日本千本株只有 2 型; 草地场株以 1 型为主 (41%); 依次为 3 型 (10%) 和 2 型 (8%), 表示地区不同感染的原虫类型也不同, 见表。

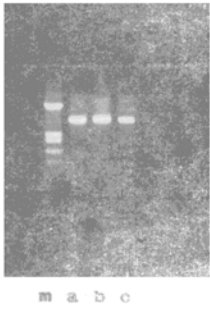


图 1 32K 蛋白编码基因的 PCR 产物。
m: PUC19/Hinf; a: 澳大利亚株
b 和 c: 日本草地场和千本株
Fig. 1 The PCR products of 32k surface
protein of *T. sergenti*

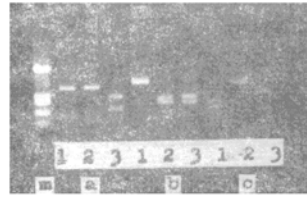


图 2 32K 表面蛋白编码基因限制性内
切酶谱
m: PUC/Hinf; a: 1 型; b: 2 型;
c: 3 型
1: Hind III; 2: Bgl I; 3: Kpn I
Fig. 2 The endonuclease cutting patterns
of the PCR products of 32k surface
protein

表 32K 表面蛋白编码基因限制性内切酶分型比例
Table Patterns of 32k protein encoding genes from
three strains of *T. sergenti*

分型 Type	比例 Ratio		
	澳大利亚株 Australia strain	千本株 Japan 1	草地场株 Japan 2
1	22/29*(76%)	0	12/29(41%)
2	0	21/26(81%)	2/29(8%)
3	7/29(24%)	0	3/29(10%)
其它 Others	0	5/26(19%)	12/29(41%)

注: * 示供分析克隆数

* Clones for analysis

** 示不能被三种内切酶消化的克隆基因。Genes cloned can not be cut with restriction endonucleases

3 讨 论

瑟氏泰勒原虫的 32 k 表面蛋白是其主要抗原, 用其单抗注入牛体内可增强牛抗攻击能力, 与此原虫附着、侵入、增殖功能有关, 有学者序列分析了此种蛋白, 但从电泳及血清学检查来看存在差异。本实验调查不同地区牛的感染株, 发现编码表面主要抗原蛋白 32 k 的基因片段不同, 这种不同是同一株感染后出现遗传变异还是同时感染不同株的原虫, 不得而知, 从常规形态学方法不能区别之。我国也有不少此种虫的发现和治理报告^[6], 但均未见有关的深入研究。本实验的研究, 可为完备疫苗提供理论依据, 同时对牛瑟氏泰勒原虫在不同地区的分化和变异提供了研究方法。

参 考 文 献

- [1] Hagiwara K et al. *Theileria sergenti* infection in the Bo-RBC-SCID mouse model. *Parasitol Res*, 1993, 79: 466~470.
- [2] Kawazu S et al. Antigenic differences between Japanese *Theileria sergenti* and other benign theileria species of cattle from Australia (*T. buffeli*) and Britain (*T. orientalis*). 1991, *Parasitol Res*, 1991, 78: 130~135.
- [3] Shirakata S et al. Localization of surface antigen on *Theileria sergenti* merozoite by monoclonal antibodies. *Jpn J Vet Sci*, 1989, 51: 831~833.
- [4] Maniatis T et al. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 145~165.
- [5] 田中雅之. 瑟氏泰勒原虫 DNA 的 PCR 诊断. 日本第三次原虫病研讨会论文集, 1993.
- [6] 郭成留 等. 磷酸伯氨喹对黄牛瑟氏泰勒虫病自然病例的疗效试验, *中国兽医杂志*, 1988, 14(4): 8~10.

ANALYSIS OF THE GENES ENCODING 32K SURFACE PROTEINS OF *T. SERGENTI* FROM AUSTRALIA AND JAPAN BY RESTRICTION ENDONUCLEASES

Wei Qiang

(*Institute of Laboratory Animal Science, CAMS, Beijing 100021, China*)

Tsuji M, Isihara C

(*School of Veterinary Medicine, Rakuno-Gakuen University, Bunkyo-dai, Ebetsu 069, Japan*)

Abstract

The genes about 900 bp encoding 32K surface protein of *T. sergenti* were amplified

by PCR from Australia and two places in Japan, and annealed with pBR322, the recombinant DNA plasmids were cloned into *E. coli*. JM109, 20~30 positive clones were screened by Tet^r/Amp^r phenotypes and the genes from each clone amplified from the plasmid DNA were digested with Hind III, Bgl I and Kpn I. Three patterns were divided based on restriction endonuclease sites, and the major pattern was different from Australia and two places in Japan.

Key words *T. sergenti*, PCR, Gene clone, Restriction endonuclease analysis

《畜牧兽医学报》在京编委会会议纪要

《畜牧兽医学报》在京编委会于1996年2月2日在中国农业科学院畜牧研究所召开。出席会议的有中国畜牧兽医学会原理事长陈凌风先生，中国畜牧兽医学会金家珍副秘书长，中国畜牧兽医期刊编辑学会理事长陈书田先生，会议有陈幼春主编主持，孔繁瑶，郭玉璞副主编以及在京编委王瑞祥、狄伯雄等30人参加会议，畜牧所领导苏振环同志亲临本次会议。

《牧业通讯》编辑部唐福坤先生也光临本会。

会议首先由《畜牧兽医学报》、编辑部负责人谭淑琴同志汇报了1995年的编辑工作。各位编委回顾学报多年来的工作，对如何把好审稿关，严格控制文章篇幅，严把英文摘要关、写作选题关等方面展开了讨论。

最后金家珍副秘书长代表学会讲话。她充分肯定学报在国内外畜牧兽医界所起的作用及编辑部工作的同时，对学报提出了殷切希望。希望学报在缩短文章刊出周期，加强期刊对外合作、交流方面加倍努力。并表示学会无论是现在还是将来都将全力以赴地支持《畜牧兽医学报》的编辑出版工作，使她成为全国一流的代表畜牧兽医界最高学术水平的刊物。在学报40周年大庆之际，建议在学会60周年大庆举办专门展台，以示汇报期刊成果，本刊积极参展。

会议就《畜牧兽医学报》创刊40周年，决定届时将通过学报刊登有关领导及畜牧兽医界知名学者的纪念性题词，以示庆贺。

《畜牧兽医学报》编辑部

一九九六年二月五日